

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Imunosni mehanizmi u razvoju upale i metaboličkog sindroma u debljini	
Trajanje projekta	01.05.2017.-01.05.2021.	
Ključne riječi (najviše do 5)	NASH, NAFLD, šećerna bolest tipa II, MCMV, inzulinska rezistencija, upala visceralnog masnog tkiva	
Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika)		
Temeljno istraživanje	da	ne
Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
Očuvanje vrste	da	ne
Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
Forenzička ispitivanja	da	ne
Održavanje kolenije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepo-znanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Pretilost je jedna od najznačajnijih i rastućih medicinskih zdravstvenih problema današnjice. Procjenjuje se da trenutno na svijetu živi više od pola milijarde debelih ljudi i preko milijarde onih s prekomjernom tjelesnom težinom. Značajan broj njih obolijeva od šećerne bolesti tipa 2 (engl. Diabetes Mellitus type 2, DM2) i nealkoholne bolesti masne jetre (engl. Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), koje često koegzistiraju i dijele zajedničke komplikacije debljine kao što su inzulinska rezistencija (IR), dislipidemija i hipertenzija, što su ujedno karakteristike i metaboličkog sindroma. Debljina je povezana s kroničnom sistemskom upalom niskog intenziteta za koju se smatra da je važan uzrok nastanka IR, koja dovodi do DM2 i NAFLD-a. Ciljanje mehanizama upale u obje bolesti je stoga obećavajući za buduće terapije. No, stvarni mehanizmi koji induciraju ili pogoršavaju upalu u debljini i uzrokuju prijelaz iz stadija pre-dijabetesa u DM2 ili iz stadija jetrene steatoze u nealkoholni steatohepatitis (engl. nonalcoholic steatohepatitis, NASH) su još uvijek uglavnom nejasni. Stoga je potrebno bolje poznavanje imunskih mehanizama nastanka DM2-a i NASH-a. U ovom projektu planiramo istražiti imunsko mehanizme koji su važni za indukciju upalnih procesa u visceralnom adipoznom (masnom) tkivu (VAT) i jetri, te su odgovorni za razvoj DM2 i NASH-a. Poseban fokus će biti na stanicama koje su sposobne prepoznati rane promjene u navedenim tkivima, kao što su γδ T stanice, stanice NK i uređeni limfociti (engl. innate	

	lymphoid cells, LLC), kao i njihova međudjelovanja s adipocitima, hepatocitima i drugim imunskim stanicama. Dodatno, naš cilj je istražiti virusne faktore koji pogoršavaju IR i imaju učinak na tranziciju iz pre-dijabetesa u DM2. U ovoj studiji koristi ćemo dobro poznate miševe modela djetom inducirane debljine (DIO), te odgovarajuće miševe mutante i druga otuda kako bismo odgovorili na postavljena pitanja.
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti iskorisćena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta)?	Epidemija debljine predstavlja svjetski zdravstveni problem koji ima svoje značajne ekonomske i socijalne posljedice. Procjenjuje se da danas ima oko pola milijarde debelih osoba u svijetu (eng. body mass index – BMI >30) te preko milijarde s prekomjernom težinom (BMI 25-30). Najčešće posljedice debljine su metabolički poremećaji poput rezistencije na inzulin perifernih tkiva koja često progredira u šećernu bolest tipa 2 i nealkoholnu masnu bolest jetre. Trenutačni je konsenzus u području pretilosti, te šećerne bolesti tipa II i nealkoholne bolesti jetre da debljina uzrokuje kroničnu upalu niskog intenziteta koja rezultira nastankom inzulinske rezistencije u različitim metabolički aktivnim tkivima što dovodi do nastanka šećerne bolesti i nealkoholne masne bolesti jetre. Stoga, sprječavanje mehanizama upale može biti obećavajući mehanizam prevencije navedenih bolesti. No, stvarni mehanizmi koji induciraju ili pogoršavaju upalu u debljini i uzrokuju prijelaz iz stadija pre-dijabetesa u DM2 ili iz stadija jetrene steatoze u nealkoholni steatohepatitis su još uvijek uglavnom nejasni. Stoga je bolje poznavanje imunskih mehanizama nastanka DM2-a i NASH-a neophodno.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti?	U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi. Broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom navedenog perioda je 2790.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi. Broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom navedenog perioda je 2790. Kod mišjeg modela nealkoholne masne bolesti jetre cilj je istražiti koje stresni aktivirane molekule se pojavljuju na površini jetre kao odgovor na AI-MN dijetu te koje imunске stanice urodne imunosti imaju glavnu ulogu u progresiji bolesti. Budući da ćemo se u navedenim istraživanjima fokusirati na inicijalne događaje (u prvih par tjedana) životinje će u navedenom periodu tek početi razvijati znakove inzulinske rezistencije i rane znakove fibroze što ne utječe na njihovu dobrobit. Očekivana razina pokusa u navedenim istraživanjima je blaga, no ako životinje počinju iskazivati znakove boli,

	nelagode ili stresa, koji su jači od blagih bez brzog oporavka, primijeniti će se humana krajnja točka. U pokusima gdje će se ispitivati utjecaj virusnih infekcija na progresiju šećerne bolesti tipa životinjama kojima smo dijelom inducirali nastanak inzulinske rezistencije bit će injiciran mišji citomegalovirus i virus limfocitnog koriomeningitisa te će se u određenom vremenskom periodu nakon infekcije provoditi test tolerancije na glukozu ili test na inzulinsku rezistenciju, a po završetku pokusa životinje će biti usmrćene, a njihovi organi/stanice analizirani. Pojedinim grupama životinja će biti injicirana protutijela u svrhu deplecije/blokade pojedinih staničnih populacija te ćemo moći odrediti koje subpopulacije stanica najjače utječu na razvoj rezistencije na inzulin i na poremećenu homeostazu glukoze. Radi navedenog, moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injekcije, pa će se životinje pratiti nakon injiciranja. Očekivana razina težine postupka je blaga. Također pojedini miševi će biti podvrgnuti operacijskom postupku VATektomije (uklanjanja visceralnog masnog tkiva), ali zbog korištenja anestezije i analgezije u skladu s pravilima veterinarske struke životinje neće ili će trpjeti minimalnu bol. Moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injekcije, pa će se životinje pratiti nakon injiciranja. Očekivana razina težine postupka je umjerena.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Uloga pojedinih stanica imunskog sustava u mehanizmima nastanka upale visceralnog masnog tkiva i NASH-a je još dobrim dijelom neistražena. S obzirom na to da su kronična sistemska upala, šećerna bolest tipa 2 i NASH složene bolesti u kojima sudjeluje više organskih sustava, nemoguće je iste istraživati na staničnim kulturama in vitro. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća. Zbog navedenog, razvijen je mišji model dijelom inducirane debljine (uzrokuje nastanak šećerne bolesti tipa 2) i Amylin prehrana (AMIN), koja unutar 16 tjedana od početka pokazuje sve faze razvoja NAFLD-a. Životinje će se koristiti s obzirom na to da ne postoji alternativne metode za istraživanje kronične upale i nastanka šećerne bolesti tipa 2 te razvoja NAFLD-a radi kompleksnih interakcija komponenti imunološkog sustava s drugim organima i organskim sustavima. Imajući u vidu kompleksnost imunološkog sustava i međusobnih interakcija pojedinih njegovih komponenti s drugim organima i organskim sustavima, in vitro istraživanja ne mogu pružiti cjelokupnu sliku stvarnih zbivanja u